

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/EP05/001390

International filing date: 11 February 2005 (11.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES

Number: P 200400464

Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 March 2005 (21.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

EP05/1390

11.02.2005



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO

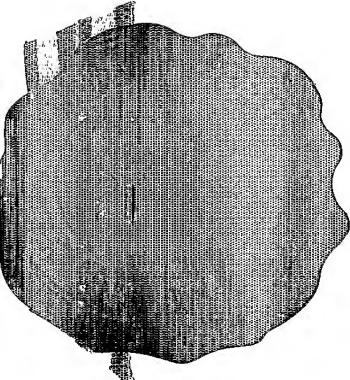


Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200400464, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 27 de Febrero de 2004.

Madrid, 13 de Diciembre de 2004



El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

c.g.

CARLOS GARCIA NEGRETE





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA

Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400464

(1) MODALIDAD

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

- ADICIÓN A LA PATENTE
- SOLICITUD DIVISIONAL
- CAMBIO DE MODALIDAD
- TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
- PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:  
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD  
FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL  
BIOIBERICA, S.A.

NOMBRE

NACIONALIDAD ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES	DNI/CIF A08384190	CNAE PYME
--------------------------	-------------------	----------------------	--------------

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO PL. FRANCESC MACIA, 7  
LOCALIDAD BARCELONA  
PROVINCIA BARCELONA  
PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA  
NACIONALIDAD ESPAÑA

TELEFONO

FAX  
CORREO ELECTRONICO  
CÓDIGO POSTAL 08029  
CÓDIGO PAÍS ES  
CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

- (1) VILA PAHÍ**
- (2) ESCAICH FERRER**
- (3) VERBRUGGEN**

FRANCISCO JAVIER  
JOSEP  
AUGUST LODEWIJK

ESPAÑOLA  
ESPAÑOLA  
BELGA

(8)

- EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR
- EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

- (1) (2) (4) (5) (6)**
- (3)**

INVENC. LABORAL

CONTRATO

SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCIÓN

"NUEVO USO TERAPÉUTICO DE UN GRUPO DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS"

MOD.310H - 1- EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:  SI  NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
--	-------------	--------	-------

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)  
SUGRAÑES MOLINÉ, PEDRO, 300-X, C. PROVENZA, 304, BARCELONA, (BARCELONA), 08008, ESPAÑA

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARQUADOS EN ROJO

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- DESCRIPCIÓN. N.º DE PÁGINAS: 18
- N.º DE REIVINDICACIONES: 25
- DIBUJOS. N.º DE PÁGINAS: 1
- LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: 0
- RESUMEN
- DOCUMENTO DE PRIORIDAD
- TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

- DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN
- JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD
- HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
- PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
- CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN
- OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

PEDRO SUGRAÑES MOLINÉ  
p.d.  
Matrícula N.º 180

Foto.: Enrique de Verdones  
(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:  
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
informacion@oepm.es  
www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 - 28071 MADRID



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

NUMERO DE SOLICITUD

P200400464

FECHA DE PRESENTACION

PATENTE DE INVENCION

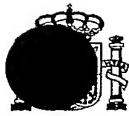
MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME
-------------------	------------------------------------	--------	--------------	----------------	---------	------	------

(7) INVENTORES: (4) VERGÉS MILANO (5) RUHÍ ROURA (6) ALÁEZ Y VERSÓN	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
		JOSEP RAMÓN CARLOS RAÚL	ES ES ES

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR	FECHA
------------------------------	-------	-------

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
--	----------------	--------	-------



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400464

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

### RESUMEN (Máx. 150 palabras)

"Nuevo uso terapéutico de un grupo de polisacáridos sulfatados".

La presente invención se refiere al uso de un polisacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero. Preferentemente el polisacárido sulfatado es inulina sulfato, más preferentemente inulina polisulfato de sodio. La presente invención también se refiere al uso de un oligosacárido sulfatado derivado de un polisacárido seleccionado entre el grupo formado por inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico, laminarina y pectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.

### GRÁFICO

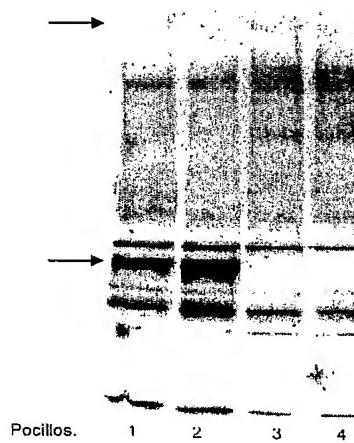


FIGURA 1

(VER INFORMACIÓN)



(12)

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(31) NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD		(33) PAÍS	(21) NÚMERO DE SOLICITUD <b>P200400464</b>
(32) FECHA				(22) FECHA DE PRESENTACIÓN <b>27 FEB. 2004</b>
				(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
(71) SOLICITANTE (S) <b>BIOIBÉRICA, S.A.</b>				
DOMICILIO <b>PI. Francesc Macià, 7 - 08029 BARCELONA</b>		NACIONALIDAD <b>Española</b>		
(72) INVENTOR (ES) (1) FRANCISCO JAVIER VILA PAHÍ, (2) JOSEP ESCAICH FERRER, (3) AUGUST LODEWIJK VERBRUGGEN, (4) JOSEP VERGÉS MILANO, (5) RAMÓN RUHÍ ROURA, (6) CARLOS RAÚL ALÁEZ Y VERSÓN				
(51) Int. Cl.	GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
 FIGURA 1				
(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN <b>"NUEVO USO TERAPÉUTICO DE UN GRUPO DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS"</b>				

(57) RESUMEN

**"Nuevo uso terapéutico de un grupo de polisacáridos sulfatados".**

La presente invención se refiere al uso de un polisacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero. Preferentemente el polisacárido sulfatado es inulina sulfato, más preferentemente inulina polisulfato de sodio. La presente invención también se refiere al uso de un oligosacárido sulfatado derivado de un polisacárido seleccionado entre el grupo formado por inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico, laminarina y pectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.

## DESCRIPCION

### **“NUEVO USO TERAPÉUTICO DE UN GRUPO DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS”**

5

#### Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere al uso de un polisacárido sulfatado para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis. De igual modo la presente invención se refiere al uso de un oligosacárido sulfatado para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis.

#### Antecedentes de la invención

La artrosis, también llamada osteoarthritis es una enfermedad degenerativa articular que afecta a la mayoría de las personas a partir de los 65 años de edad, y que se caracteriza por una paulatina degradación del tejido cartilaginoso, unido a la presencia de inflamación y dolor. La inflamación se presenta particularmente cuando la enfermedad está en estado avanzado, siendo de diferente naturaleza que la inflamación que se observa en la artritis reumatoide, y generalmente sólo es un componente minoritario en la patología artrósica. La artrosis se puede definir como la degeneración del cartílago hialino articular. Secundario a este efecto se produce la afectación de la membrana sinovial y el hueso subcondral, así como la formación de hueso nuevo en los márgenes de las superficies de la articulación. La etiología de la artrosis es desconocida y su evolución lenta.

El cartílago permite que los huesos se muevan deslizándose unos sobre otros. También absorbe la tensión que produce el movimiento físico. En la artrosis, la superficie del cartílago se rompe y desgasta causando que los huesos se muevan unos contra otros, produciendo

fricción, dolor, hinchazón, y pérdida de movimiento en la articulación. Con el paso del tiempo la articulación puede deformarse.

Como ayuda para la diagnosis de la artrosis se utilizan principalmente dos técnicas: la radiografía, que es el método más sencillo 5 para identificar los cambios óseos de la articulación, y la resonancia magnética nuclear (RMN) que a diferencia de la anterior permite visualizar simultáneamente todos los componentes de la articulación.

En condiciones normales, la renovación del cartílago es un proceso muy lento que consiste en una constante síntesis (anabolismo) y 10 degradación (catabolismo) de los componentes de la matriz extracelular. El condrocito es la célula responsable de este metabolismo que debe estar coordinado.

En condiciones patológicas, este proceso se altera dado que la renovación del cartílago se acelera conduciendo a una reparación precoz 15 del tejido cartilaginoso causada por un desequilibrio entre el programa anabólico y catabólico del condrocito que conlleva una degradación del cartílago. La reacción de reparación resulta de una hiperproliferación de los condroцитos, conjuntamente con un incremento en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular del cartílago por parte de estas 20 células (D. Hamermam *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 320, 1322-1330 (1989)). Existe, por tanto, un balance entre síntesis y degradación del cartílago que controla dicha reacción homeostática y que depende de hormonas sistémicas y de factores de crecimiento cuyas secreciones disminuyen 25 con la edad. La degradación del cartílago está regulada por enzimas y radicales libres producidos por tejidos adyacentes, pero también por el mismo condrocito.

Resaltaremos los siguientes tratamientos farmacológicos actuales de la artrosis:

Sustancias de acción sintomática que actúan de forma rápida 30 como los analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticoides e inhibidores de la ciclooxygenasa 2 (COX-2).

Sustancias de acción sintomática que actúan de forma algo más lenta conocidas como SYSADOA (Symptomatic Slow Acting Drug for Osteoarthritis (Fármacos con acción sintomática lenta para el tratamiento de la artrosis)) (M.G. Lequesne, *Rev. Rhum.* (Eng./Ed.), 61, 69-73 (1994)), entre las que se encuentran el ácido hialurónico, el condroitín sulfato y el sulfato de glucosamina. Este grupo se caracteriza por presentar un efecto que se inicia después de 2-3 semanas de tratamiento y persiste de 2 a 6 meses después de cesar su administración.

En la bibliografía se han encontrado documentos acerca de otras aplicaciones de los polisacáridos sulfatados de la presente invención:

R.V. Jones (US 2,686,779) describe un procedimiento para preparar sales de inulina sulfato con metales alcalinos. En dicha patente se resalta que las sales alcalinas de inulina sulfato con diversos grados de sulfatación se han aplicado en la industria química como espesantes para pastas, adhesivos y como aditivos para fangos utilizados en la perforación de pozos petrolíferos.

Se ha descrito que la inulina sulfato presenta una actividad anticoagulante (*Arkiv for kemi, mineralogi o. geologi.*, Bd 24B (5), 1-4 (1946)) y antilipémica (*Arch. Int. Pharmacodyn.*, XCIX, 334 (1954)).

V.G. Nair *et al.* (US 4,021,545) dan a conocer que sales de inulina polisulfato (completamente sulfatada) tienen una actividad inhibidora del complemento, por lo que según los inventores podrían utilizarse en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, ciertos tipos de vasculitis, etc.

G. Franz *et al.* (*Bioactive Carbohydrate Polymers*, 47-58, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000) describen la actividad anticoagulante y antitrombótica del pullulan sulfato.

C.C. Lee (EP 499.164) reivindica, aunque no describe en ningún ejemplo, una composición inyectable que puede contener carragenano para suplementar los fluidos lubricantes naturales. En el citado documento no mencionan el carragenano polisulfato.

T. Kanamaru *et al.* (US 5.135.920) describen que el curdlan sulfato es un agente angiostático. S. Alban *et al.* (*Thromb. Res.* 78 (3), 201-10 (1995)) describen que el mismo compuesto actúa como anticoagulante y antitrombótico.

5 T. Hata *et al.* (JP 04257509) dan a conocer la aplicación de ácido algínico sulfato como hidratante en preparaciones cosméticas. L. Lange *et al.* (ES 2.064.736) describen la utilización de alginato sulfato para inhibir el colesterol pancreático.

E. Besterman (*Brit. Med. J.*, 310 (1957, I)) describe que el polisacárido laminarina sulfato posee actividad antilipémica. H. Q. Miao *et al.* (*Int. J. Cancer*, 83 (3), 424-31 (1999)) revelan la actividad antimetastásica de laminarina sulfato. P. Bohlen *et al.* (WO 03/006645) describen que el polisacárido laminarina sulfato inhibe la actividad heparanasa, la cual, según reivindican, se encuentra asociada, entre otros, a procesos inflamatorios, diabetes o artritis.

L. Lange *et al.* (ES 2.064.736) dan a conocer que el polisacárido pectina sulfato es útil para tratar los niveles elevados de colesterol en sangre.

Hasta el momento no se ha encontrado descrito el uso de inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato o pectina sulfato con cualquier grado de sulfatación o de carragenano polisulfato en el tratamiento o profilaxis de la artrosis.

Tampoco se ha encontrado descrito hasta el momento el uso de los oligosacáridos sulfatados correspondientes a los polisacáridos sulfatados citados en el tratamiento o profilaxis de la artrosis.

Por todo lo dicho se desprende que el proporcionar un fármaco útil en el tratamiento de la artrosis, es todavía un problema de la terapéutica.

### Explicación de la invención

El problema a solucionar por la presente invención es proporcionar polisacáridos sulfatados alternativos para utilizar en el tratamiento o profilaxis de la artrosis. La solución que corresponde con el primer aspecto de la invención se refiere al uso de un polisacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.

En una realización preferida el polisacárido sulfatado se selecciona entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato y curdlan sulfato. Entre estos, los más preferidos son inulina sulfato y gelano sulfato.

En una realización más preferida el polisacárido sulfatado se encuentra total o parcialmente salificado con un metal alcalino o alcalinotérreo. Preferentemente el metal alcalino es sodio y el polisacárido preferido es inulina sulfato de sodio. Igualmente preferido es el polisacárido gelano sulfato de sodio.

Más preferida es la inulina sulfato de sodio que presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 25% y el 62%, sobre base anhidra.

Aún más preferida es la inulina sulfato de sodio que presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 55% y el 62%, sobre base anhidra.

En una realización igualmente preferida el polisacárido sulfatado se encuentra parcialmente hidrolizado.

En otra realización igualmente preferida el polisacárido sulfatado es un polisacárido polisulfatado, seleccionado entre el grupo formado por inulina polisulfato, gelano polisulfato, pullulan polisulfato, curdlan polisulfato, ácido algínico polisulfato, laminarina polisulfato y pectina polisulfato. Entre estos, el más preferido es inulina polisulfato,

preferentemente inulina polisulfato de sodio. Igualmente preferido es gelano polisulfato, preferentemente gelano polisulfato de sodio.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de carragenano polisulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o  
5 profilaxis de la artrosis en un mamífero.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un oligosacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, derivado de un polisacárido seleccionado entre el grupo formado por inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico,  
10 laminarina y pectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero. Preferentemente el oligosacárido sulfatado deriva de la inulina. También preferentemente el oligosacárido sulfatado deriva del gelano.

En una realización preferida el oligosacárido sulfatado es un  
15 oligosacárido polisulfatado.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un oligosacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, obtenido por síntesis química, cuya estructura corresponde a una porción de la estructura de un polisacárido sulfatado  
20 seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.

En una realización especialmente preferida el medicamento se  
25 adapta para administración oral.

Igualmente, en una realización especialmente preferida el medicamento se adapta para administración intraarticular.

Los polisacáridos sulfatados de la presente invención son conocidos, y se pueden obtener mediante sulfonación parcial o total de  
30 los grupos hidroxilos libres presentes en la estructura de los polisacáridos: inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico, laminarina y pectina. El

carragenano polisulfato se obtiene mediante sulfonación total de los hidroxilos libres presentes en el carragenano.

La sulfonación de un grupo hidroxilo da lugar al correspondiente grupo sulfato.

5 El carragenano ya contiene en su estructura algunos grupos sulfato. En la presente invención se utiliza el carragenano polisulfato.

Cuando en la memoria de la presente invención se habla de grado de sulfatación se refiere al % de grupos sulfatos sobre base anhidra (respecto a la molécula).

10 Cuando en la memoria de la presente invención se habla de polisacáridos sulfatados se refiere a un polisacárido sulfatado con cualquier grado de sulfatación. A un polisacárido sulfatado con un elevado grado de sulfatación, en la literatura se tiende a denominarlo polisacárido polisulfatado, y por supuesto, cuando el polisacárido está 15 totalmente sulfatado también se le denomina polisacárido polisulfatado. Así pues, en la presente invención están incluidos los polisacáridos polisulfatados (inulina polisulfato, carragenano polisulfato, gelano polisulfato, pullulan polisulfato, curdlan polisulfato, ácido algínico polisulfato, laminarina polisulfato y pectina polisulfato).

20 Los polisacáridos sulfatados se pueden obtener por sulfonación parcial o total de los hidroxilos libres de los polisacáridos comerciales citados anteriormente, utilizando procedimientos descritos en la literatura, como por ejemplo mediante ácido clorosulfónico/piridina (T. Astrup *et al.*, *Acta Physiol. Scand.*, 8, 215-226 (1944)), o bien utilizando ácido 25 piperidina-N-sulfónico (N. Kinzo *et al.*, *Carbohyd. Res.*, 21, 420-426 (1972)), o bien empleando el complejo trióxido de azufre-piridina (C. Mähner *et al.*, *Carbohyd. Res.*, 331, 203-208 (2001)).

Para obtener diferentes grados de sulfatación se pueden modificar los procedimientos citados anteriormente (variar la concentración de los 30 reactivos, temperatura de reacción, tiempos de reacción etc...). También, si se desea, se pueden sulfonar selectivamente diferentes hidroxilos del

polisacárido, mediante protección/desprotección de los hidroxilos del polisacárido.

Si el polisacárido de partida tiene un peso molecular medio demasiado elevado, si se desea, se puede hidrolizar parcialmente antes o 5 después de la sulfonación.

Los oligosacáridos sulfatados que se utilizan en la invención se pueden obtener mediante hidrólisis enzimática o química (procedimientos bien establecidos en la literatura) del polisacárido comercial, seguido de sulfonación, o bien directamente por hidrólisis enzimática o química del 10 polisacárido sulfatado. También se pueden obtener por síntesis química.

Cuando en la memoria de la presente invención se habla de una sal fisiológicamente aceptable se refiere a una sal de metal alcalino, como por ejemplo sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, como por ejemplo calcio o magnesio, o bien una sal orgánica, como por ejemplo sal con trimetilamina, con trietilamina, o con un aminoácido, como por ejemplo lisina, arginina, prolina, glicina o serina. 15

La salificación del polisacárido sulfatado se puede llevar a cabo a través de procedimientos químicos sencillos bien conocidos.

Para utilizar en el tratamiento o prevención de la artrosis, los 20 polisacáridos sulfatados de la invención, en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas, recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences Handboock*, Mack Pub. Co., N.Y., USA.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden 25 administrarse al paciente en dosis requeridas. La administración de las composiciones puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intraarticular, subcutánea, intramuscular, tópica, sublingual, intradermal o intranasal. Las composiciones 30 farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del polisacárido sulfatado de la presente invención, en forma ácida

o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, compuesto particular, vía de administración y de otros factores bien conocidos en la técnica. Además, se entenderá que  
5 dicha dosificación de compuesto activo puede administrarse en unidades de dosis única o múltiple para proporcionar los efectos terapéuticos deseados. Si se desea, pueden emplearse otros agentes terapéuticos junto con los proporcionados por la presente invención.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención generalmente  
10 estarán en forma sólida, líquida o como gel. Entre las preparaciones farmacéuticas en forma sólida que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención se incluyen polvos, minigránulos (pellets), comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos, supositorios y otras formas galénicas sólidas. Entre las preparaciones en forma líquida se  
15 incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones y microesferas. Se contemplan también las preparaciones de formas sólidas que se desean convertir, inmediatamente antes de ser utilizadas, en preparaciones en forma líquida para la administración por vía oral, parenteral o intraarticular. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y  
20 emulsiones.

#### Breve descripción de la figura

La Figura 1 representa un Western Blott. La flecha superior indica la zona de agrecano intacto y la flecha inferior indica la zona de fragmentos de agrecano marcados con el anticuerpo NITGE G1. En el primero de los pocillos se sembró una muestra control (sin tratamiento), en el segundo una muestra tratada con interleuquina-1 (IL-1), en el tercero una muestra tratada con 100 µg/mL de inulina polisulfato del Ejemplo Químico1 y en el cuarto una muestra tratada con IL-1 y 100  
30 µg/mL de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1.

Descripción detallada de la invención

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

5       Ejemplo QuímicoEjemplo 1: Preparación de inulina polisulfato de sodio

Con agitación constante y a una temperatura < de 6°C, se añadieron gota a gota 88 mL (1,32 mol; 1,8 eq /OH) de ácido clorosulfónico sobre 580 mL (7,20 mol) de piridina seca. La mezcla resultante se calentó a 75°C y posteriormente se adicionaron 40 g (0,25 mol) de inulina (Fibruline Standar, comercializada por Trades S.A.). Se continuó la agitación y el calentamiento a 100°C por espacio de 5 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se adicionaron 50 mL de agua desionizada para destruir el exceso de ácido clorosulfónico. Durante este paso la temperatura del medio se elevó ligeramente y aparecieron dos fases.

El crudo de reacción se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente. La fase superior (piridina) se separó por succión, mientras que la fase inferior oleosa se vertió sobre una solución al 10 % de acetato de sodio en metanol. El precipitado que se formó se dejó sedimentar. El sobrenadante se separó por decantación y se descartó.

El tratamiento con la solución metanólica de acetato de sodio se repitió dos veces y en el último paso el sólido se separó por filtración a vacío con un filtro de profundidad tipo k-100 (Pall Corporation. Seitz-k-25 100).

El filtro obtenido (sólido marrón) se disolvió en agua destilada y la solución resultante se filtró a vacío por un filtro de profundidad k-100 para eliminar restos de materia insoluble procedentes de la reacción.

El filtrado procedente del paso anterior era una solución de color 30 ámbar oscuro que se trató con amonio cuaternario (Cuartamin). Como consecuencia, se formó un sólido muy abundante que se aisló por

filtración a vacío utilizando una pre-capa de tierras Hyflo (100 g). El filtro se lavó abundantemente con agua destilada.

El complejo inulina polisulfato-Cuartamin se separó cuidadosamente de las tierras de filtración y se trató con una solución acuosa de NaCl 20%, a 80°C, durante dos horas.

Transcurridas las dos horas de reacción se detuvo el calentamiento, y cuando la temperatura del medio alcanzó 60°C se adicionó isopropanol. La agitación se mantuvo por espacio de 30 min. y luego la mezcla se vertió en un embudo de decantación para separar la fase acuosa de la orgánica.

La fase orgánica (isopropanol + amonio cuaternario) se desechó. La fase acuosa se filtró a vacío para eliminar los restos de tierras Hyflo.

Sobre la fase acuosa se vertió una mezcla de metanol / acetona. El precipitado marrón que se formó se dejó sedimentar. El sobrenadante se separó por decantación y se desechó. El sedimento se lavó con metanol y posteriormente se disolvió en agua desionizada.

El pH de la solución resultante se ajustó entre 10,5-11 con NaOH 10%. La solución se calentó a 50°C y se trató durante 15 min. con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente se detuvo el calentamiento y el pH del medio se ajustó a 5,5 con una solución de ácido acético al 2%.

Cuando la solución decolorada alcanzó la temperatura ambiente, se vertió sobre ella una solución de metanol / acetato de sodio 10%. Inmediatamente se formó un precipitado blanco o ligeramente amarillo que se dejó sedimentar.

El sobrenadante se separó por decantación y el sedimento se anhidrificó abundantemente con metanol.

La inulina sulfato se separó por filtración a vacío con placa porosa Nº 3 y se secó en estufa de vacío a 30°C hasta que la concentración de metanol fue igual o inferior a 0,3 %.

El producto se obtuvo como un polvo fino, amorfo, de color blanco o ligeramente amarillo.

Determinación del grado de sulfatación (sulfatos orgánicos) de la inulina polisulfato de sodio obtenida

Se pesaron exactamente 150 mg de producto, se disolvieron en agua y la solución resultante se llevó hasta 250 mL con el mismo disolvente. Se 5 pipetearon 5 mL de esta solución, se transfirieron a un vaso de precipitados de 50 mL y se añadieron 25 mL de agua. Se valoró fotométricamente a 420 nm con una solución de cloruro de N-cetilpiridinio (CPC) al 0,1% (0,00279 M).

- 10 Se calculó el contenido en sulfatos mediante la siguiente ecuación:

$$\%SO_4 = \frac{V \times 0,00279 \times 96 \times 100}{\frac{5 \times (100 - PPS) \times P}{250 \times 100}} = \frac{13,392 \times V \times 100}{\frac{100 - PPS}{100} \times P}$$

Donde:

- 15 V: Volumen consumido de la solución de CPC 0,1% en mL.  
 P: Peso de muestra en mg.  
 PPS: Pérdida de peso por desecación del producto (105°C, 4 h) en %.

- 20 Grado de sulfatación obtenido: 58,0% expresado sobre base anhidra, lo cual corresponde a una molécula de inulina completamente sulfatada (sulfonación de todos los hidroxilos)  
 Piridina residual libre y en forma de sal: 127 ppm (el límite permitido es 200 ppm)  
 Sulfatos libres: 0,08%  
 25 IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2900 (C-O-H), 1247 (S=O), 800 (C-S-O)

Ejemplos farmacológicos

- La resistencia del cartílago y su capacidad de reparación está determinada por los proteoglicanos de la matriz extracelular, y 30 especialmente por los agrecanos. La síntesis de éstos agrecanos por los

condrocitos articulares y su calidad disminuyen con la edad, lo que constituye uno de los factores principales implicados en el desarrollo de la artrosis.

5        Ejemplo 1: Evaluación de los efectos *in vitro* de inulina polisulfato sobre la síntesis de agrecanos extracelulares en un cultivo primario de condrocitos humanos

Este procedimiento se puede aplicar a la evaluación de cualquier polisacárido sulfatado de la presente invención.

10      1A: Niveles de agrecanos determinados mediante la incorporación de  $^{35}\text{S}$

Materiales y métodos

Los condrocitos articulares humanos se aislaron según los 15 métodos descritos por W.T. Green Jr. (*Clin. Orthop.*, 75, 248-260 (1971)) y K.E. Kuettner *et al.* (*J. Cell. Biol.*, 93, 743-750 (1982)).

Estos condrocitos se cultivaron en un gel de agarosa según el método descrito por P.D. Benya *et al.* (*Cell*, 30, 215-224, (1982)), y modificado por G. Verbruggen *et al.* (*Clin. Exp. Rheumatol.*, 8, 371-378 20 (1990)) y por M. Cornelissen *et al.* (*J. Tiss. Cult. Meth.*, 15, 139-146 (1993)).

La síntesis de agrecanos se determinó mediante la incorporación de  $^{35}\text{S}$ , utilizando como precursor radioactivo sulfato de sodio marcado  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ . Después de dos semanas de cultivo, se introdujeron 10  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  25 de precursor radiomarcado en el medio de cultivo durante 48 h, así como también el compuesto a ensayar (inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1) a diferentes concentraciones (0,0, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Los  $^{35}\text{S}$  agrecanos sintetizados de nuevo se acumularon parcialmente en la matriz de agarosa intercelular o bien se liberaron en el 30 medio de incubación.

Finalizado el periodo de incubación, el gel de agarosa se rompió mecánicamente y después se digirió mediante 3 mL de una solución de agarosa de 50 U/mL en un tampón fosfato 0,067 M de pH 6,0, en presencia de inhibidores de proteinasa.

5 La suspensión así obtenida se centrifugó, el sobrenadante que contenía los  $^{35}\text{S}$  agrecanos de la matriz interterritorial, y el medio de incubación que contenía los metabolitos de  $^{35}\text{S}$  agrecanos liberados en la matriz extracelular se reunieron posteriormente por cromatografía.

10 El residuo, que contenía los condrocitos y los  $^{35}\text{S}$  agrecanos asociados, se trató durante 48 horas con 1 mL de una solución de cloruro de guanidinio 4,0 M en un tampón acetato 0,05 M de pH 5,8 que contenía los inhibidores de proteinasa.

15 El objetivo de esta operación es la extracción de los  $^{35}\text{S}$  agrecanos asociados a las células. La solución obtenida se centrifugó para separar las células del sobrenadante que se separó posteriormente por cromatografía. Las operaciones de cromatografía de las diferentes fracciones obtenidas se llevaron a cabo sobre gel de Sephadex G25 en un tampón fosfato pH 6,8 que contenía 0,01 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , para separar los  $^{35}\text{S}$  agrecanos del  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  libre.

20 La radioactividad de cada uno de los eluyentes macromoleculares obtenidos se midió y se relacionó con el número de condrocitos contenidos en el cultivo inicial y se expresó en pg de  $^{35}\text{SO}_4$  incorporados en los agrecanos, por millón de condrocitos y por hora.

### Resultados

25 Se presentan en las Tablas 1, 2 y 3.

Las tablas muestran la eficacia remarcable de la inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1, en la producción total de agrecanos sintetizados de nuevo (Tabla 3). La inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 también es capaz de aumentar la producción de agrecanos tanto en la matriz interterritorial (Tabla 1) como los asociados a las células (Tabla 2)

La actividad óptima se encuentra a una concentración alrededor de 0,5 µg/mL.

Tabla 1

pg $^{35}\text{S}/10^6 \text{ celas/h}$	% cambio	% Total	IPS (µg/mL)
7.710		67,4	0,0
7.818	1,4	66,2	0,1
12.383	60,6	70,7	0,5
10.887*	41,2*	70,7	1,0
8.340	8,2	67,9	5,0

5 Cantidad de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agrecanos de la matriz interterritorial, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 µg/mL). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agrecanos. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. \* p<0,05 respecto al control no tratado.

10

Tabla 2

pg $^{35}\text{S}/10^6 \text{ celas/h}$	% cambio	% Total	IPS (µg/mL)
2.378		20,9	0,0
2.737	15,1	23,5	0,1
3.064*	28,8*	18,4	0,5
2.662	11,9	17,9	1,0
2.041	14,2	17,4	5,0

15 Cantidad de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agrecanos de la matriz extracelular asociada a las células, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 µg/mL). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agrecanos. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. \* p<0,05 respecto al control no tratado.

20

Tabla 3

pg $^{35}\text{S}/10^6 \text{ celas/h}$	% cambio	% Total	IPS (µg/mL)
11.429		100	0,0
11.756	2,9	100	0,1
17.312*	51,5*	100	0,5
15.281*	33,7*	100	1,0
12.106	3,0	100	5,0

25 Cantidad total de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agrecanos sintetizados de nuevo, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 µg/mL). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agrecanos. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. \* p<0,05 respecto al control no tratado.

### 1B: Niveles de agrecanos determinados mediante inmunocito-química

#### Materiales y métodos

Los condrocitos articulares humanos se aislaron y se cultivaron  
5 según los métodos descritos anteriormente.

La acumulación de agrecanos asociados a los condrocitos se  
midió, después de una semana de cultivo, mediante la técnica de  
inmunocitoquímica descrita por L. Wang *et al.* (*Osteoarthritis Cart.*, 9,  
248-260 (2001)). Los condrocitos fueron tratados con interleuquina-1 (IL-  
10 1) para simular una situación de inflamación y catabolismo. La inulina  
polisulfato del Ejemplo Químico 1 se adicionó conjuntamente con IL-1.

Finalizado el periodo de incubación, los condrocitos se liberaron del  
gel de agarosa según el método descrito. Los condrocitos y los agrecanos  
asociados se estudiaron mediante citometría de flujo utilizando  
15 anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la parte  
proteica de los agrecanos.

#### Resultados

Se presentan en la Tabla 4.

Esta Tabla confirma la eficacia de la inulina polisulfato del Ejemplo  
20 Químico 1 sobre la producción de agrecanos asociados a las células.

Además se puede observar que existe una relación dosis-efecto,  
ya que a mayor dosis de compuesto se produce un aumento mayor de la  
producción de agrecanos asociados a las células.

Tabla 4

	Donante M32		Donante F45	
	M±SD	%Cambio	M±SD	%Cambio
Control	18,9±0,2	105,6	36,5±0,2	201,7
IL-1	17,9±0,3	100,0	18,1±0,2	100,0
IL-1+IPS (0,5 µg/mL)	-----	-----	20,4±0,2*	112,7*
IL-1+IPS (1,0 µg/mL)	20,8±1,2*	116,2*	26,6±0,1*	147,0*
IL-1+IPS (2,5 µg/mL)	21,6±1,1*	120,7*	39,0±0,2*	215,5*
IL-1+IPS (5,0 µg/mL)	25,0±1,4*	139,7*	-----	-----

5 Intensidad de fluorescencia media en los condrocitos después de un marcaje de  
 agrecano con anticuerpos conjugados con fluoresceína. M±SD= media ± desviación  
 estándar. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al grupo tratado con IL-1. IL-1 =  
 Interleuquina-1. IPS= inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1. \* p<0,05 respecto al  
 grupo tratado con IL-1.

10

Ejemplo 2: Efecto *in vitro* de inulina polisulfato sobre la síntesis de  
 agrecanos en cultivo de condrocitos de condrosarcoma de rata

Este procedimiento se puede aplicar a la evaluación de cualquier  
 polisacárido sulfatado de la presente invención.

15

Materiales y métodos

Se establecieron cultivos de condrocitos de condrosarcoma de  
 ratas en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta llegar al 80% de  
 confluencia en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's  
 20 Medium) (+4,5 g/L de glucosa) + 10% de suero bovino fetal (FCS).  
 25

Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y fue sustituido con 1  
 mL de DMEM (+4,5 g/L de glucosa) + 10% FCS + 20 µCi/mL <sup>35</sup>S  
 $(Na_2^{35}SO_4)$  y 1, 10 y 100 µg/mL de inulina polisulfato del Ejemplo Químico  
 1. La incorporación se facilitó durante 18 horas y después se finalizó con  
 25 la adición de guanidina HCl sólida.

Se separaron las macromoléculas solubilizadas por la guanidina  
 HCl de los isótopos no incorporados mediante cromatografía y se  
 determinó la radioactividad mediante un contador de centelleo.

### Resultados

Se presentan en la Figura 1, donde se representa un Western Blott resultado de los distintos tratamientos aplicados a un cultivo de condrocitos de condrosarcoma de rata. En dicha figura puede observarse como el tratamiento de los condrocitos con IL-1 provoca un aumento de la degradación de agrecano, por lo que la banda de fragmentos de agrecano marcados con el anticuerpo NITGE G1 se hace más gruesa. Por el contrario, cuando el cultivo es tratado con inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1, en presencia o no de IL-1, se inhibe la degradación de agrecano, por lo que la banda anteriormente mencionada se estrecha hasta casi desaparecer. Así pues, la inulina polisulfato es capaz de disminuir la degradación de agrecanos en un cultivo de condrocitos, por lo que también frenará la degradación de la matriz extracelular en casos de pacientes con artrosis.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de un polisacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.
- 5 10 15 20 25 30
- 2.- Uso según la reivindicación 1, en el que el polisacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo se selecciona entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato y curdlan sulfato.
- 3.- Uso según la reivindicación 2, en el que el polisacárido sulfatado es inulina sulfato.
- 4.- Uso según la reivindicación 2, en el que el polisacárido sulfatado es gelano sulfato.
- 5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polisacárido sulfatado se encuentra total o parcialmente salificado con un metal alcalino o alcalinotérreo.
- 6.- Uso según la reivindicación 5, en el que el metal alcalino es sodio.
- 7.- Uso según la reivindicación 6, en el que el polisacárido sulfatado en forma de sal de sodio es inulina sulfato de sodio.
- 8.- Uso según la reivindicación 6, en el que el polisacárido sulfatado en forma de sal de sodio es gelano sulfato de sodio.
- 9.- Uso según la reivindicación 7, en el que la inulina sulfato de sodio presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 25% y el 62%, sobre base anhidra.
- 10.- Uso según la reivindicación 9, en el que el grado de sulfatación está comprendido entre el 55% y el 62%, sobre base anhidra.

- 11.- Uso según la reivindicación 1, en el que el polisacárido sulfatado se encuentra parcialmente hidrolizado.
- 12.- Uso según la reivindicación 1 u 11, en el que el polisacárido sulfatado es un polisacárido polisulfatado.
- 5        13.- Uso según la reivindicación 12, en el que el polisacárido polisulfatado se selecciona entre el grupo formado por inulina polisulfato, gelano polisulfato, pullulan polisulfato, curdlan polisulfato, ácido algínico polisulfato, laminarina polisulfato y pectina polisulfato.
- 10      14.- Uso según la reivindicación 13, en el que el polisacárido polisulfatado es inulina polisulfato.
- 15      15.- Uso según la reivindicación 14, en el que la inulina polisulfato es inulina polisulfato de sodio.
- 16      16.- Uso según la reivindicación 13, en el que el polisacárido polisulfatado es gelano polisulfato.
- 17.- Uso según la reivindicación 16, en el que el gelano polisulfato es gelano polisulfato de sodio.
- 18.- Uso de carragenano polisulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.
- 20      19.- Uso de un oligosacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, derivado de un polisacárido seleccionado entre el grupo formado por inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico, laminarina y pectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.
- 25      20.- Uso según la reivindicación 19, en el que el oligosacárido sulfatado deriva de la inulina.
- 21.- Uso según la reivindicación 19, en el que el oligosacárido sulfatado deriva del gelano.
- 30      22.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el oligosacárido sulfatado es un oligosacárido polisulfatado.

- 23.- Uso de un oligosacárido sulfatado en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, obtenido por síntesis química, cuya estructura corresponde a una porción de la estructura de un polisacárido sulfatado seleccionado entre el grupo formado por inulina sulfato, gelano sulfato, pullulan sulfato, curdlan sulfato, ácido algínico sulfato, laminarina sulfato y pectina sulfato para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la artrosis en un mamífero.
- 5 24.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el medicamento se adapta para administración oral.
- 10 25.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el medicamento se adapta para administración intraarticular.

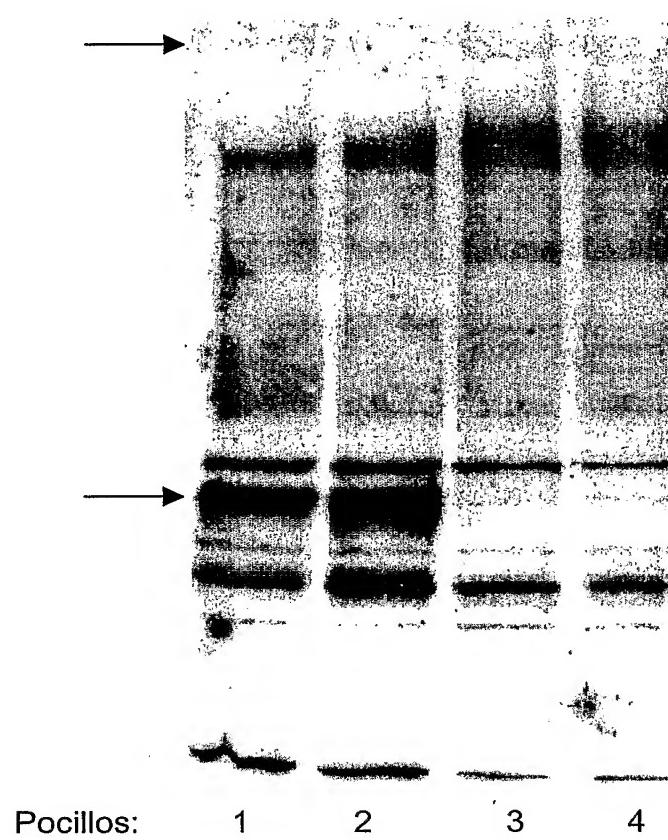


FIGURA 1